

COGITATIONES

Die Gültigkeitsgrenze der Eichkurve bei Null*

Zu den Grundlagen für Eichkurven in der quantitativen Photometrie gehört die Abgrenzung der Bereiche, in denen wegen methodischer Unzulänglichkeiten die Ergebnisse von Analysenproben ungültig sind. In diesem Zusammenhang ist der Unsicherheitsabschnitt in der Nähe des Nullwertes bisher wenig beachtet worden, obwohl man in der Literatur ausdrückliche Hinweise findet, dass gerade zur Kennzeichnung einer neuen Methode die mit Sicherheit bestimmbare Mindestmenge gehöre¹. Der Unsicherheitsabschnitt entsteht, indem man aus den Ansätzen für einen linearen Bereich und Messung der Extinktionen die die Punkte im Koordinatensystem Extinktion-Menge verbindende Gerade bis Null verlängert.

Die Eichkurvenwerte sind arithmetische Mittel aus Mehrfachbestimmungen, die erfahrungsgemäss normal verteilt um den Mittelwert streuen. In einem Abschnitt bei Null ist nun die spätere Ablesung von Versuchswerten unsicher, weil der Extinktionswert für die Menge Null (d. h. Reagenzienblindwert) ebenfalls aus einer Schar streuender Einzelwerte ermittelt ist, die einen bestimmten Teil der Eichkurve überdecken und so gleich Null setzen.

In der Praxis wird der Bereich teilweise abgesichert durch σ -Grenzen der Reagenzienblindwertverteilung. Dabei schätzt man σ mit der Formel für den mittleren Fehler des Einzelwertes s^2 (Tabelle I) und zieht die Grenze bei $2s$ ^{3,4} oder für wissenschaftliche Arbeiten bei $3s$ ¹.

Ein solches Vorgehen hat ausser Acht gelassen, dass nicht nur der Nullwert, sondern auch der so ermittelte Mindestmengenwert bei experimenteller Nachprüfung wegen seiner Streuung einen Unsicherheitsbezirk bei Null bilden, dass also zwei Streubereiche in ihrer Auswirkung bedacht werden müssen. Nach dieser Überlegung genügt der $3s$ -Bereich der Nullverteilung nicht den Ansprüchen eines Vertrauensbereiches. Die korrekte Vertrauensgrenze liegt bei einem Eichkurvenwert, dessen zugehörige Häufigkeitsverteilung sich von der Nullwertverteilung statistisch gesichert unterscheidet. Welche Signifikanzstufe für diese Sicherung gewählt wird, hängt von den Genauigkeitsansprüchen ab. Dem $3s$ -Bereich würde in diesem Sinne eine 3σ -Äquivalent-Signifikanzschwelle entsprechen mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,73%⁵. Der Prüfung auf Signifikanz, hier mit Hilfe des t -Verfahrens ausgeführt, liegt eine Gegenüberstellung von Signifikanzschranken der untersuchten Messwertverteilungen zugrunde, und der gesicherte Eichkurvengrenzwert soll so beschaffen sein, dass die untere Signifikanzschranke seiner Häufigkeitsverteilung mit der oberen Signifikanzschranke der Nullwertverteilung zusammenfällt.

Anhand der Porter-Silber-Reaktion auf 17-Hydroxy-Corticosteroide, bei der Phenylhydrazin mit der Dioxyceton-Seitenkette des Steroids ein Osazon bildet⁶ mit einem Absorptionsmaximum des Reaktionsansatzes bei 410 nm⁷, soll ein Beispiel erläutert werden. Aus je 20 Bestimmungen pro Eichkurvenwert mit Hydrocortisonreinsubstanz haben wir eine Standard Eichkurve erstellt, deren Grundlagen Tabelle I zeigt (Messung mit Zeiss-Photometer Elko III, Filter 405 Hg, Schicht 0,5 cm).

Der Reagenzienblindwert als Nullwert der Eichkurve hat bei 20 Messungen die mittlere Extinktion $0,0204 \pm 0,0021$, der 0,25 γ Hydrocortisonreinsubstanzwert die Extinktion $0,0342 \pm 0,0052$. Bei einer orientierenden

Prüfung auf einen signifikanten Unterschied zwischen diesem untersten Eichkurvenwert und dem Nullwert mit dem t -Test müsste für die 3σ -Schwelle und den Freiheitsgrad $\nu=38$ ein t -Wert von 3,1⁸ erreicht werden. Der tatsächliche Wert errechnet sich mit $t=8,56$. 0,25 γ liegt damit zu hoch und erfüllt nicht die Voraussetzung des Vertrauensgrenzwertes.

Den gesuchten Grenzwert könnte man nun experimentell iterativ erhalten, indem man durch neue Versuchsserien mit Einsatz von kleineren Mengen Reinsubstanz von 2 Seiten den Bereich einengt, bis man den

Tabelle I

a	OW = 0	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0
\bar{x}	0,0204	0,0342	0,0479	0,0750	0,1025	0,1279
s	0,0021	0,0052	0,0040	0,0033	0,0034	0,0036
Vk	–	15,22	8,36	4,40	3,31	3,07
$\log Vk$	–	1,1824	0,9222	0,6453	0,5198	0,4871

Daten der Porter-Silber-Eichkurve auf 17-Hydroxy-Corticosteroide:

a eingesetzte Menge Reinsubstanz

Ia \bar{x} arithmetisches Mittel der Einzelwerte

Ib s Standardabweichung² $s = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2 - \bar{x} \sum x}{n-1}}$

Ic Vk Variationskoeffizient⁸ $Vk = \frac{100 s}{\bar{x}}$

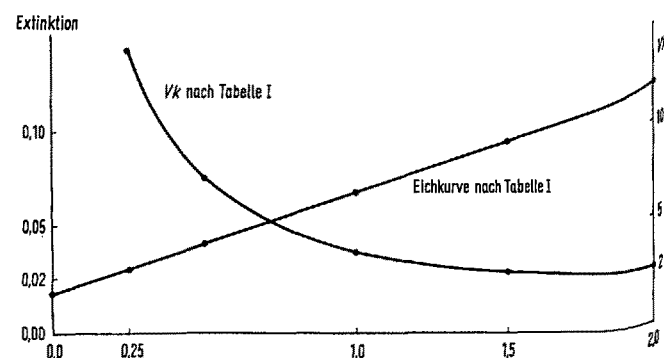


Fig. 1. Porter-Silber-Eichkurve mit Änderung des Variationskoeffizienten.

¹ H. BENDER, Arch. Hyg. Bakt. 145, 586 (1961).

² Dokumenta Geigy, Wiss. Tabellen (Basel), 6. Auflage, p. 160/161 (1960).

³ R. RICHTERICH und J. P. COLOMBO, Klin. Wschr. 40, 529 (1962).

⁴ R. RICHTERICH und J. P. COLOMBO, Das ärztl. Labor 2, 33 (1962).

⁵ H. M. RAUEN, Biochemisches Taschenbuch (Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956), p. 1197.

⁶ E. DICZFALUSY, G. BIRKE und L. O. PLANTIN, Klin. Wschr. 34, 225 (1956).

⁷ A. WALSER und H. P. SCHLUNKE, Exper. 15, 71 (1962).

⁸ Dokumenta Geigy, Wiss. Tabellen, p. 167 (1960).

⁹ Dokumenta Geigy, Wiss. Tabellen, p. 32 (1960).

Wert näherungsweise erreicht. Bei derartigen Vorgehen ist der experimentelle Einsatz sehr aufwendig, und es soll darum versucht werden, die experimentelle Iteration durch eine rechnerische zu ersetzen.

Der t -Test auf statistische Sicherung beruht auf den Signifikanzschranken der t -Verteilung. Diese ist der standardisierten Normalverteilung eng verbunden, jedoch nur abhängig vom Freiheitsgrad ν ⁸. Die Signifikanzschranken sind aus den Stichproben zu gewinnen nach¹⁰:

$$\text{IIa)} \quad p_o = \bar{x} + \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{als obere und}$$

$$\text{IIb)} \quad p_u = \bar{x} - \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{als untere Signifikanzschranke.}$$

Nach Voraussetzung soll p_o der Nullwertverteilung zusammenfallen mit p_u der Grenzwertverteilung. $p_o = p_u$.

Mit $t = 3,45$ ¹¹ bei Freiheitsgrad $\nu = 19$ und 3σ -Äquivalent erhalten wir für $p_o = p_u = 0,0222$. Ermittelt ist so ein Signifikanzschrankenpaar als Parameter zweier Verteilungen, die bei einseitiger Prüfung auf Signifikanz unter Anwendung des t -Testes mit $t = 3,45$, $\nu = 38$ gerade die Signifikanzstufe des 3σ -Äquivalentes erreichen.

Gegeben ist nur eine der beiden Häufigkeitsverteilungen mit dem Eichkurvenwert für Null und seiner Streuung. Von der anderen ist bekannt die untere Signifikanzschranke (p_{ugw}) und der Freiheitsgrad ν . Der Mittelwert (\bar{x}_{gw}) soll mit Hilfe des Variationskoeffizienten nach der t -Verteilung geschätzt werden und ergibt die Extinktion unseres gesuchten Vertrauensgrenzwertes.

Aus Vk (Tabelle I) erhalte ich für den Mittelwert:

$$\bar{x} = \frac{100 s}{V k}.$$

Zwischen Variationskoeffizient Vk und Substanzmenge a besteht die in Figur 1 gezeigte Verknüpfung. Die Beziehung ist nicht linear gegen Null ansteigend, wird jedoch linear nach Transformation in das System:

$$V k' = \log V k, \quad a' = \log_2 a$$

in der Form:

$$\log V k = h + b \log_2 a.$$

Dabei ist h Interzept auf der Ordinate und b das Steigungsmass der Geraden. In Figur 3 ist sie eingezeichnet als Regressionsgerade (Grundlagen Tabelle II) nach dem Prinzip der Summe der kleinsten Abweichungsquadrate¹².

Die Gerade gibt mir anhand von Vk Auskunft über die Streuung s für den zugehörigen Extinktionsmittelwert \bar{x}

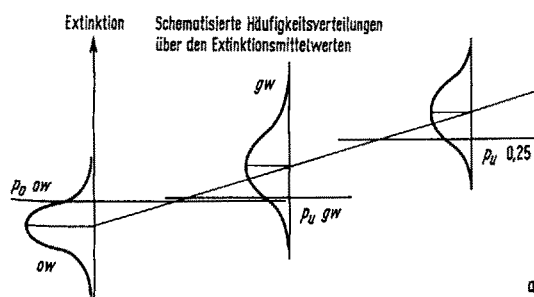


Fig. 2. Schema der Nullwertverteilung ow und der Grenzwertverteilung gw mit gemeinsamer Signifikanzschranke $p_o = p_u$; $p_u - 0,25$ = untere Signifikanzschranke der Häufigkeitsverteilung der $0,25 \gamma$ zugehörigen Extinktionen.

bei jedem Eichkurvenwert, da nach Logarithmieren von I_c (Tabelle I) und Auflösen nach:

$$\log s = \log V k + \log \bar{x} - 2$$

ist.

Zur Berechnung entnehme ich aus der Eichkurve (Figur 1) \bar{x} in Abhängigkeit von a , aus Figur 3 den entsprechenden Wert $\log V k$ und erhalte nach Entlogarithmieren s für \bar{x} bei a .

Für die Werte von a zwischen $0,10 \gamma$ und $0,25 \gamma$ beginnt nun die eingangs erwähnte Rechnungsiteration anstelle der experimentellen, indem mit der verlängerten Regressionsgeraden für $a < 0,25$ eine Serie \bar{x} und s bestimmt wird. Bei gegebenem t und n (Voraussetzung) gewinne ich damit nach IIb eine Schar unterer Signifikanzschranken, die zur Abszisse parallel verlaufen im Abstand p_u (Tabelle III).

Tabelle II

Daten der Regressionsgeraden (Figur 3) nach Tabelle I

$\Sigma x_a = \Sigma \log_2 a$	$S_{xx} = 5,942$	$b = -0,242$
$\Sigma y_a = \Sigma \log V k$	$S_{xy} = -1,435$	

Tabelle III. Iteration zur Bestimmung p_u im Abschnitt $a < 0,250 \gamma$ im Zusammenhang mit Figur 3 und 4

	3s-Grenze		mit 3s-Äquival. gesich. Gw			
0,01968	-	0,02166	0,0223	0,02361	0,02550	p_u
0,00794	-	0,00694	-	0,00621	0,00558	s
1,488	-	1,410	-	1,340	1,272	$\log V k$
0,0258	0,0265	0,0270	0,0275	0,0284	0,0298	\bar{x}
0,100	0,114	0,125	0,133	0,150	0,175	a in γ

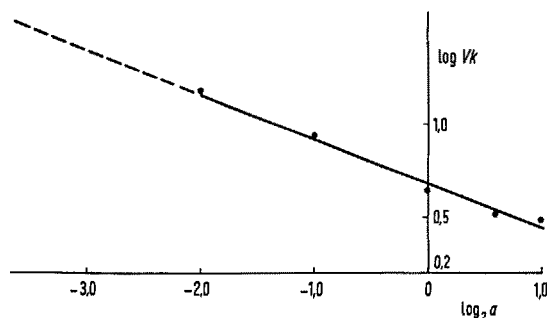


Fig. 3. Regressionsgerade nach Tabelle II zur transformierten $V'k$ -Kurve Punkte nach Tabelle I.

¹⁰ G. W. OERTEL, *Chemische Bestimmung von Steroiden im menschlichen Plasma* (Springer Verlag, Berlin 1962), p. 95.

¹¹ H. M. RAUEN, *Biochemisches Taschenbuch* (Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956), p. 1201.

¹² A. LINDER, *Statistische Methoden* (Birkhäuser Verlag, Basel 1960), p. 152.

Trage ich im Koordinatensystem der Eichkurve Figur 1 die Signifikanzschrankengrößen abhängig von a als Punkte ein, so erhalte ich als deren Verbindungsline (Figur 4) näherungsweise eine Gerade, die die obere Signifikanzschranke der Nullwertverteilung schneidet. Der Schnittpunkt hat als Ordinate die untere Signifikanzschrankengröße der gesuchten Grenzwertverteilung und als Abszisse die Größe a , die als Mindestmenge Substanz von Null unterschiedlich noch erfasst werden kann und somit unser gesuchter Wert ist.

Gegenüber $a = 0,114 \gamma$, der der 3s-Grenzwert der Nullverteilung ist, beträgt der Vertrauensgrenzwert $0,134 \gamma$.

Diskussion. Obwohl durchwegs die Eichkurven auf Analysengänge so abgestimmt werden, dass letzthin die Messwerte im zentralen Bereich sich häufen, sind dennoch Ergebnisse, die in den Randabschnitten liegen, nicht ausgeschlossen und manchmal besonders bedeutungsvoll. Gerade bei relativ kleinen Versuchswerten taucht immer die Frage nach der Verlässlichkeit auf, und bei exakt durchgearbeiteten Methoden muss gegen Null eine Sicherheitsgrenze gezogen werden, die besonders dann unerlässlich ist, wenn eine spätere mathematisch-statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgen soll. Jegliche Verwendung relativ kleiner Messwerte ist inkorrekt, wenn nicht vorher belegt wurde, dass sie sich von Null signifikant unterscheiden. Schlussfolgerungen daraus ohne Sicherung können ebensogut gültig sein wie auch nichtsagend, weil sie gleicherweise versuchsbedingt, wie auch durch methodische Fehler entstanden sein können.

Die Abgrenzung eines Toleranzbereiches, der Null mit grosser Wahrscheinlichkeit ausschliessen würde (bei $n = 20$ bedeutet 3s-Grenze eine Wahrscheinlichkeit von 99%)¹³, dürfte nicht wie bei BENDER¹ oder RICHTERICH^{3,4} von der Nullverteilung ausgehen, da der Nullwert als Reagenzienblindwert kein gleichberechtigter Eichkurvenwert ist. Es fehlt ihm ein Arbeitsgang, nämlich der der zupipettierten Substratmenge. Aus diesem Grunde wurde in Tabelle I unseres Beispiels der hier die Eichkurvenstreuung charakterisierende Variabilitätskoeffizient für den Nullwert weggelassen. Will man nun Null anhand eines Toleranzbereiches gesichert ausschliessen, so geht das nur über die Häufigkeitsverteilung der echten Eichkurvenwerte, d.h. in diesem Falle kleiner Eichkurvenwerte, die sich Null schrittweise nähern und deren Streuung zur Berechnung des Toleranzbereiches benutzt wird. Das Verfahren bietet sich an bei Messungen mit konstantem Nullwert.

Haben wir dagegen die Reagenzienblindwertstreuung, so soll der Vertrauensgrenzwert der Eichkurve sich signifikant abheben.

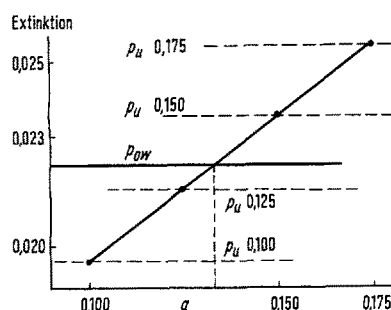


Fig. 4. Signifikanzschrankenschar p_u der Iteration Tabelle III System der Figur 1 (p_{0w} = obere Signifikanzschranke der Nullwertverteilung).

Der Reagenzienblindwert hat mit dem Nullwert nur den Eichkurvenpunkt gemeinsam; während er einen Fixwert darstellt, Extinktion der Reagenzien ohne Substrat, wäre der wahre Nullwert eine gedankliche Approximation mit immer kleiner werdenden Substratmengen, als Grenzwert dann mit unendlich kleiner Menge.

Bei diesen Reaktionen in Annäherung auf Null nimmt die relative Streuung, als Variationskoeffizient der prozentuale Anteil am Mittelwert, erheblich und nicht linear zu.

Die Zunahme hat wohl ihre Ursache neben apparativen Ungenauigkeiten in Pipettierfehlern, die möglicherweise bei Aufstellung einer Eichkurve zu verringern wären unter Verwendung geeichter oder Mikropipetten oder von Büretten. Mit verminderter Streuung der Eichkurvenwerte würde die Vertrauensgrenze gegen Null aber nur heruntersetzt, das Prinzip jedoch nicht geändert. Die nicht lineare Steigerung des Variationskoeffizienten (Figur 1) ist nicht geeignet, in den kleinen Bereichen der Menge genaue Streuungswerte eruieren zu lassen. Nach LINDER¹⁴ sind gelegentlich nicht lineare in lineare Beziehungen zu transformieren mit Hilfe logarithmischer Systeme, und eine Möglichkeit ergab sich hier für den $\log V_k$ der Extinktionsmittelwerte abhängig vom quadrischen Logarithmus der Menge (Figur 3). Diese lineare Beziehung hat keinen induktiven Wert zur Verallgemeinerung, eine Nachprüfung in jedem erneut zur Debatte stehenden Fall ist notwendig.

Die zugehörige Regressionsgerade lässt Zwischenwerte der Streuung korrekt interpolieren, unsere Rechnungswerte sind extrapoliert im gestrichelten Teil der Figur 3 und haben damit nicht die Vertrauenswürdigkeit wie interpolierte Ergebnisse. Will man die Frage des Nullbereiches für weitere Beispiele klären, so empfiehlt sich neben dem üblichen linearen Bereich der Standard Eichkurve auch die Extinktionen relativ kleiner Werte zu erstellen, die im Bereich des gesuchten Grenzwertes liegen. Dann ist dessen Interpolation ohne grossen Fehler möglich.

Im Beispiel der Porter-Silber-Eichkurve für 17-Hydroxy-Corticosteroide ist der Unterschied der 3s-Grenze mit $0,114 \gamma$ gegenüber dem Vertrauensgrenzwert $0,133 \gamma$ mit etwa 17% nicht bedeutend. Jedoch weisen nicht alle Methoden grosse Präzision auf, und bei sonstigen klinisch-chemischen Nachweisverfahren wird man erheblich andere Unterschiede erwarten können¹⁵.

Summary. A confidence limit in the neighbourhood of zero in photometry can be obtained by calculating parameters of the distributions of reagent blank and standard values.

F. SCHARF

Zahn- und Kieferklinik der Universität Freiburg i. Br. (Deutschland), 10. Februar 1964.

¹³ Dokumenta Geigy, Wiss. Tabellen, p. 44 (1960).

¹⁴ A. LINDER, *Statistische Methoden* (Birkhäuser Verlag, Basel 1960), p. 206.

¹⁵ Herrn Dipl. Mathematiker I. GOTTSCHESKI vom Institut für mathematische Statistik der Universität Freiburg danke ich für richtungweisende Unterstützung und die freundliche Kontrolle der Ergebnisse.